

Isolation of nucleic acids

Publication number: JP2001520894 (T)

Publication date: 2001-11-06

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:






- international: **C12N15/00; C12N15/10; C12Q1/68; G01N37/00; C12N15/00; C12N15/10; C12Q1/68; G01N37/00; (IPC-1-7): C12Q1/68; C12N15/00**

- European: **C12N15/10A2; C12N15/10A3; C12Q1/68A4; C12Q1/68A4**

Application number: JP2000051811T 19981023

Priority number(s): DE19971046874 19971023; WO1998EP06756 19981023

Also published as:

 DE19746874 (A1)
 JP2008245649 (A)
 JP2008263978 (A)
 EP1049801 (A1)
 EP1049801 (B1)

more >>

Abstract not available for JP 2001520894 (T)

Abstract of corresponding document: **DE 19746874 (A1)**

The invention relates to novel methods and devices for isolating and purifying nucleic acids on surfaces. The invention is directed at methods which use surfaces, e.g. porous membranes, on which the nucleic acids can be immobilized in a simple manner from the sample containing the nucleic acids, and can be detached again using equally simple method steps. The inventive simple process guidance makes it possible to be able to carry out the methods, particularly, in a completely automatic manner. An additional aspect of the invention is directed at binding nucleic acids to an immobile phase, particularly to a membrane, in such a way that they can be easily detached again from said phase in a successive reaction step, and can optionally be used in additional applications, such as digestion by restriction, RT, PCR or RT-PCR or in every other aforementioned suitable analysis or enzyme reaction. Finally, the invention is directed at special isolation vessels with which the inventive methods can be carried out.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-520894

(P2001-520894A)

(43) 公表日 平成13年11月6日 (2001.11.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/00		C 1 2 N 15/00	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2000-518111(P2000-518111)	(71) 出願人	キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ ュレンクテル ハフツング
(86) (22) 出願日	平成10年10月23日 (1998.10.23)		ドイツ連邦国、ヒルデン 40724、マック ス フォルマー シュトラッセ 4
(85) 翻訳文提出日	平成12年4月20日 (2000.4.20)	(72) 発明者	バスチャン ヘルゲ
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 8 / 0 6 7 5 6		ドイツ連邦国、デュッセルドルフ D- 40597、ベンラザー シュロザリー 94 a
(87) 国際公開番号	W O 9 9 / 2 2 0 2 1	(72) 発明者	ガウチ シモーヌ
(87) 国際公開日	平成11年5月6日 (1999.5.6)		ドイツ連邦国、デュッセルドルフ D- 40597、ベンラザー シュロザリー 43
(31) 優先権主張番号	1 9 7 4 6 8 7 4 . 8	(74) 代理人	弁理士 塩澤 寿夫 (外 2 名)
(32) 優先日	平成 9 年10月23日 (1997.10.23)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面上の核酸類の単離及び精製のための方法

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも以下の段階による表面上の核酸類の単離のための方法を包含する。核酸類を所定の方向から表面へ投入すること；前記表面上での核酸類の固定化；前記表面からの固定化された核酸類の放出；及び、主に投入方向における放出された核酸類の除去。付加は、好ましくは上方から行われる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の段階により核酸類を単離するための方法。

- 核酸類を所定の方向から表面へ投入すること；
- 前記表面上での核酸類の固定化；
- 前記表面からの固定化された核酸類の放出；及び
- 主に投入方向における前記表面から放出された核酸類の除去。

【請求項2】 前記チャージは上方 (top) から行われるという事実を特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 固定化と放出段階との間で、少なくとも1種の洗浄バッファーを用いて固定化された核酸類の洗浄を行うという事実を特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記洗浄が、各洗浄バッファーのために以下の段階を含むという事実を特徴とする請求項3に記載の方法。

- 予め決められた量の洗浄バッファーの表面への輸送；及び
- 吸引による表面を通した前記洗浄バッファーの抜き取り。

【請求項5】 前記核酸類の投入及び固定化は以下の段階を含むという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

- 固定化バッファーとの前記核酸類の混合；
- 表面上での固定化バッファーを用いた核酸類の投入；
- 主に投入方向における表面を通した液体成分の抜き取り。

【請求項6】 前記段階の少なくとも1つは、自動機械によって完全に自動で行われ得るという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項7】 前記方法における全ての段階が制御配列 (controlled sequence) における自動機械によって行われ得るという事実を特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 核酸類の単離の大部分が同時に行われ得るという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項9】 放出と除去段階との間で、以下の段階の少なくとも1つが行われ得るという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

- 核酸類における少なくとも1つの化学反応の実施；
- 表面上での核酸類の固定化；及び
- 表面からの固定化された核酸類の放出。

【請求項10】 核酸類の固定化のために、鉱酸とアルカリ及びアルカリ土類金属類との塩類の水溶液が使用されるという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項11】 核酸類の固定化のために、アルカリ又はアルカリ土類ハロゲン化合物若しくは硫酸塩類が使用されるという事実を特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】 核酸類の固定化のために、硫酸ナトリウム又はカリウム又はマグネシウムのハロゲン化合物が使用されるという事実を特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】 核酸類の固定化のために、アルカリ又はアルカリ土類金属と、一塩基若しくは多塩基又は多官能性 (polyfunctional) 有機酸類とからの塩類の水溶液が使用されるという事実を特徴とする請求項1～9の1項に記載の方法。

【請求項14】 核酸類の固定化のために、有機ジカルボン酸類のナトリウム、カリウム、又はマグネシウム塩類の水溶液が使用されるという事実を特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記有機ジカルボン酸が、シュウ酸、マロン酸、又は琥珀酸であるという事実を特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】 核酸類の固定化のために、ナトリウム又はカリウム塩類の水溶液が、ヒドロキシカルボン酸又はポリヒドロキシカルボン酸とともに使用されるという事実を特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項17】 前記ポリヒドロキシカルボン酸がクエン酸であるという事実を特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】 核酸類の固定化のために、脂肪族又は非環式飽和又は不飽和炭化水素のヒドロキシル誘導体が使用されるという事実を特徴とする請求項1～9に記載の方法。

【請求項19】 前記ヒドロキシル誘導体として、Cl-C5アルカノール類が使用されるという事実を特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記Cl-C5アルカノールとして、メタノール、エタノール、n-プロパノール、tert.-ブタノール又はペンタノールが使用されるという事実を特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記ヒドロキシル誘導体として、アルダイト(al d i t e)が使用されるという事実を特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項22】 核酸類の固定化のために、フェノール又はポリフェノールが使用されるという事実を特徴とする請求項1～9に記載の方法。

【請求項23】 固定化された核酸類の洗浄のために、請求項4～22の1項による塩溶液又はバッファー溶液が使用されるという事実を特徴とする請求項3～22に記載の方法。

【請求項24】 核酸類の放出[のために]、水性塩又はバッファー溶液が使用されるという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項25】 核酸類の放出のために、水が使用されるという事実を特徴とする請求項1～23の1項に記載の方法。

【請求項26】 核酸類の固定化のために、カオトロピック剤が使用されるという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項27】 前記カオトロピック剤が、トリクロロ酢酸塩類、チオシアン酸塩類、過塩素酸塩類、ヨウ化物類、又は塩酸グアニジニウム、イソチオシアン酸グアニジニウム又は尿素の群の塩であるという事実を特徴とする請求項26に記載の方法。

【請求項28】 カオトロピック剤の0.01～10Mの水溶液が、核酸類の固定化のために、単独で、又は他の塩類との組み合わせで使用されるという事実を特徴とする請求項26又は27に記載の方法。

【請求項29】 カオトロピック剤の0.1～7Mの水溶液が、核酸類の固定化のために、単独で、又は他の塩類との組み合わせで使用されるという事実を特徴とする請求項28に記載の方法。

【請求項30】 カオトロピック剤の0.2～5Mの水溶液が、核酸類の固定化のた

めに、単独で、又は他の塩類との組み合わせで使用されるという事実を特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項31】 過塩素酸ナトリウム、塩酸グアニジニウム、イソチオシアン酸グアニジニウム、ヨウ化ナトリウム、又はヨウ化カリウムの水溶液が、核酸類の固定化のために使用されるという事実を特徴とする請求項26～30の1項に記載の方法。

【請求項32】 前記表面が膜であるという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項33】 前記膜が、疎水性膜であるという事実を特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記疎水性膜が、極性基を有するポリマーから成るという事実を特徴とする請求項33に記載の方法。

【請求項35】 前記膜が、疎水化された (hydrophobized) 表面を有する疎水性膜であるという事実を特徴とする請求項32又は33に記載の方法。

【請求項36】 前記膜が、ナイロン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、並びにアクリル酸共重合体、ポリウレタン、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリフルオロカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンフルオリド、ポリビニリデンジフルオリド、ポリエチレン-テトラフルオロエチレン共重合化物 (copolymerized)、ポリエチレン-クロロトリフルオロエチレン共重合化物、又はポリフェニレンスルフィドから成るという事実を特徴とする請求項33～35に記載の方法。

【請求項37】 前記表面又は前記膜が、疎水化されたナイロンから成るという事実を特徴とする請求項35又は36に記載の方法。

【請求項38】 前記膜が、ある場合には、アルミニウム又はジルコニウム塩類、四級有機化合物類、尿素誘導体類、脂質修飾メラミン樹脂類、シリコン類、有機亜鉛化合物類、又はグルタル酸 (glutaric) ジアルデヒドの混合物とともに、パラフィン類、ワックス類、金属石鹸類の群からの疎水性コート剤を用いてコートされるという事実を特徴とする請求項35～37に記載の方法。

【請求項39】 前記膜が、親水性又は親水化された (hydrophilized) 膜であ

るという事実を特徴とする請求項35～37に記載の方法。

【請求項40】 前記膜が、親水化されたナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、並びにアクリル酸共重合体、ポリウレタン、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリフルオロカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンフルオリド、ポリビニリデンジフルオリド、ポリエチレン-テトラフルオロエチレン共重合化合物、ポリエチレン-クロロトリフルオロエチレン共重合化合物、又はポリフェニレンスルフィドから成るという事実を特徴とする請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記膜における細孔が、0.001～50 μ m 好ましくは0.01～20 μ m 最も好ましくは0.05～10 μ mの直径を有するという事実を特徴とする請求項32～40に記載の方法。

【請求項42】 前記表面が、疎水性フリース (fleece) であるという事実を特徴とする請求項1～25に記載の方法。

【請求項43】 前記フリースが、シリカゲルフリースであるという事実を特徴とする請求項42に記載の方法。

【請求項44】 核酸類の固定化のために、カオトロピック剤が使用されるという事実を特徴とする請求項43に記載の方法。

【請求項45】 前記カオトロピック剤が、トリクロロ酢酸塩類、チオシアン酸塩類、過塩素酸類、ヨウ化物類、又は塩酸グアニジニウム、イソチオシアン酸グアニジニウム、もしくは尿素の群からの塩であるという事実を特徴とする請求項44に記載の方法。

【請求項46】 0.01～10Mのカオトロピック剤の水溶液が、単独で、又は他の塩類と組み合わせて、核酸類の固定化のために使用されるという事実を特徴とする請求項44又は45に記載の方法。

【請求項47】 0.1～7Mのカオトロピック剤の水溶液が、単独で、又は他の塩類と組み合わせて、核酸類の固定化のために使用されるという事実を特徴とする請求項46に記載の方法。

【請求項48】 0.2～5Mのカオトロピック剤の水溶液が、単独で、又は他の塩類と組み合わせて、核酸類の固定化のために使用されるという事実を特徴とする

請求項47に記載の方法。

【請求項49】 過塩素酸ナトリウム、塩酸グアニジニウム、イソチオシアン酸グアニジニウム、ヨウ化ナトリウム、又はヨウ化カリウムの水溶液が、核酸類の固定化のために使用されるという事実を特徴とする請求項44～48に記載の方法。

【請求項50】 固定化が、pH～11において行われるという事実を特徴とする前述の請求項の1項に記載の方法。

【請求項51】 前記膜の片側における核酸類の固定化、及び同じ側におけるそれらの単離のための核酸類の放出のための少なくとも1つの膜の使用。

【請求項52】 前記膜が、ナイロン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリカーボネート、ポリアクリレート、並びにアクリル酸共重合体、ポリウレタン、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリフルオロカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンフルオリド、ポリビニリデンジフルオリド、ポリエチレン-テトラフルオロエチレン共重合化合物、ポリエチレン-クロロジフルオロエチレン共重合化合物、又はポリエチレンスルフィドからなるという事実を特徴とする請求項51に記載の方法。

【請求項53】 前記膜が、疎水化されたナイロン膜であるという事実を特徴とする請求項52に記載の方法。

【請求項54】 前記表面又は膜が、ある場合には、アルミニウム又はジルコニウム塩類、四級有機化合物類、尿素誘導体類、脂質修飾メラミン樹脂類、シリコン類、有機亜鉛化合物類、又はグルタル酸 (glutaric) ジアルデヒドの混合物とともに、パラフィン類、ワックス類、金属石鹸類の群からの疎水性コート剤を用いてコートされる親水性表面又は膜であるという事実を特徴とする請求項51～53の1項に記載の使用。

【請求項55】 前記膜の大部分が、マルチウェルプレート上の単離装置に設置されるという事実を特徴とする請求項51～54の1項に記載の使用。

【請求項56】 請求項1～49の1項において作動するという事実を特徴とする自動装置。

【請求項57】 バッファー及び溶液の表面への及び表面から離す適用を実行す

る又は実行し得る少なくとも1つの真空装置とともに備えられるという事実を特徴とする請求項55に記載の自動装置。

【請求項58】 前記核酸類の固定化が、pH \sim 11において行われるという事実を特徴とする請求項1 \sim 50の1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、表面上の核酸類の単離及び精製のための新しい方法に関する。

【0002】

生物学的及び臨床的試料材料からの核酸類の単離及び精製は、核酸類に基づく処理技術が用いられ、又は核酸類に基づく科学技術が実際に利用 (access) の秘訣である、作業分野のために極めて重要である。その例は、実父確定分析 (paternity analysis)、組織適合試験、遺伝病の同定、ゲノム (genome) 分析、分子診断、伝染病の決定、動物及び植物繁殖、移植遺伝子 (transgenic) 調査、生物学及び医薬、並びに多数の関連領域における基礎調査を包含する。それらの中に含まれる核酸類が、問題とされる分析手順において直接使用され得るようなやり方で、生物学的又は臨床的試料を調製する際に、一般に困難に遭遇する。

【0003】

技術水準 (the state of the art) は、DNAの精製のための多くの方法を既に包含している。我々は、例えば、バーンボイム (Burnboim) の方法 [Methods in Enzymology 100 (1983) 243] により、クローニング、及び同様に他の実験的方法の目的のためにプラスミドDNAをどのように精製するかを知っている。この方法において、細菌由来の透明な溶解物は、4～24時間の間、塩化セシウム勾配 (gradient) に曝され、そして遠心分離される。この段階の後に、DNAの抽出及び沈殿が通常行われる。この方法は、一方では非常に高価な装置を必要とし、他方では、長時間を要し、費用集約的 (cost intensive) であり、かつ自動化することができないという欠点を有する。

【0004】

DNAの単離のために透明な溶解物が使用されるその他の技術は、イオン交換クロマトグラフィー [Oblap et al., J. Chromatog. 296 (1984) 339] 及びゲル濾過 [Moreau et al., Anal. Biochem. 166 (1987) 188] からなる。これらの方法は、主に塩化セシウム勾配の代替として提供されるが、しかし、通常高濃度の塩類を含み、かつ著しく希釈された溶液中で行われるので、装置を多数要する (apparatus intensive) 溶媒供給系及び得られたDNAフラクションの沈殿を要する。

【0005】

マルコ (Makco) ら[Anal. yt. Biochem, 121 (1982) 382]及びヴォゲルスタイン (Vogelstein) ら[Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 615]は、核酸類を含む抽出物からのDNAが、高濃度のヨウ化ナトリウム又は過塩素酸ナトリウムに曝される場合に、DNAのみは小さなガラスシンチレーション (scintillation) 管、機械的手法により細かく粒子状化された繊維ガラスシートのガラス繊維膜に密着する一方、RNA及びタンパク質類はそうではないことを見出した。この手法において結合されたDNAは、例えば、水を用いて溶出することができる。

【0006】

例えば、VD 87/06621において、PMDF膜上での核酸類の固定化が説明されている。しかし、PMDF膜と結合した核酸類は、次の段階においては溶出しにくい。代わりにこの膜を、全ての結合された核酸類とともに、PCRアタッチメント (attachment) 内に直接導入する。最終的に、この国際特許出願及び他の文献において、疎水性表面又は膜は、ほぼ十分な収量で核酸類を固定化し得るために、一般に前もって水又はアルコールを用いて湿らせなければならないことが記載されている。

【0007】

一方、例えば、PCR 逆転写PCR サンライズ (SunRise)、LCX分岐DNA、NASB A又はタクマン (TaqMan) テクノロジー及びPCRのためのほぼリアルタイムの定量技術のような、いくつかの最近の応用のために、核酸類を、固体相から直接放出でき得ることは、明らかに必要である。この関連において、VD 87/06621は、核酸類が、この方法において使用された膜から事実回収され得る一方、この回収は問題をはらみ、かつ核酸類の定量的な単離には全く適さないことを我々に教示している。さらに、この方法において得られた核酸類は、比較的非常に希薄であるので、それらを濃縮及び単離するための次の段階が、明らかに必要となる。

【0008】

上述の理由のために、技術水準において知られている方法は、特に核酸類を得るための方法の自動化に関しては、工程設計の観点から、できる限り単純かつ生産的な核酸の単離のための適当な開始点になり得ない。

【0009】

本発明の目的は、それ故、核酸類の単離のために、技術水準において知られている方法の欠点を克服すること、及び多くのさらなる技術的消耗なしに、ほぼ完全に自動化され得る方法を利用できるようにすることである。

【0010】

本発明に関して、前記方法は、独立特許請求項1、独立特許請求項51による応用、及び独立特許請求項56による自動装置により解決される。本発明のさらには有利な局面及び態様は、独立特許請求項、説明及び添付の図から明らかになる。

【0011】

この関連において、本発明は、例えば、核酸類が、核酸類を含有する試験試料から、簡単な方法で固定化されることができ、かつ簡単な手順の (procedural) 段階によって再度放出され得る多孔性膜のような表面を使用する方法に関する。特に、本発明が依存する簡単な手順は、この方法を完全に自動で行うことを可能にする。

【0012】

本発明の他の態様は、後続の段階においてそれらがこの相から直ちに放出され、かつ所望により、例えば、制限的消化、RT、POR若しくはRT-POR、又は上記に記載のその他の適当な分析的若しくは酵素的反応のような、他の適用において使用され得るような手法において、特に核酸類を固定化相、とりわけ膜へ結合することである。

本発明は、以下の段階により、核酸類の単離のための手順を提供する。

- 核酸類を所定の方向から表面へ付加すること (loading) ;
- 前記表面上での核酸類の固定化 ;
- 前記表面からの固定化された核酸類の放出 ; 及び
- 主に付加方向における前記表面から放出された核酸類の除去。

【0013】

投入 (charging) は、好ましくは上方 (top) から行われる。この場合には、重力は放出のため、及びそれ自身の放出のために使用されるべきバッファを回収するために使用され得る。固定化と放出段階との間に、固定化された核酸類の洗浄

が、少なくとも1種の洗浄バッファーを用いて行われ得る。各洗浄バッファーのために、この洗浄は、好ましくは以下の段階を含む。

- 予め決められた量の洗浄バッファーの表面への適用、及び
- 吸引による前記表面を介しての洗浄バッファーの引き抜き(pulling)。

【0014】

核酸類の付加及び固定化は、再度以下の段階を含むことができる。

- 固定化バッファーと核酸類との混合、
- 前記表面へ固定化バッファーとともに核酸類を適用すること、及び
- 主に付加方向における前記表面を介しての液体成分の抜き取り。

【0015】

この手順は、それが容易に自動化でき、その結果、少なくとも1つの段階が、自動装置を用いて完全に自動で行われ得るという利点を有する。この手順における全ての段階は、自動装置により、導かれた一連の段階(a guided series of steps)において行われ得ることもまた、可能である。

【0016】

これらの場合において特に、手動操作においてもまた、核酸類の大部分が同時に単離が行われ得ることが可能である。

【0017】

最終的に、本発明に関する方法において、以下の段階が放出と除去段階との間で、少なくとも1回行われ得る。

- 核酸類を用いた少なくとも1つの化学反応の実施；
- 前記表面における核酸類の固定化；及び
- 前記表面からの固定化された核酸類の放出。

【0018】

上述のように、核酸類は、それが適用され、かつ固定化されたのと同じ方向における表面から主に溶出(放出)される。“同じ方向”とは、基本的に、180度以下の角度からのいずれの方向をも意味し、よって、溶出の間、前記核酸類は、いずれの環境下においても表面を貫通しないが、それらが表面へ適用された投入方向の反対方向において、表面から除去される。好ましい態様において、一方、

他のバッファー、即ち、ある場合には洗浄バッファーを含む核酸類が投入中に見出され得るバッファーは、表面を通して抜き取られ、さもなければ輸送される。単離が、その膜がその装置の全直径を覆う装置中にある膜において行われる場合、投入の好ましい方向は、上方からである。この場合には、除去段階は、再度上方から行われる。図2は、例えば、上方から投入され、かつ核酸類の除去が上方において行われる漏斗型単離装置を示す。

【0019】

しかし、他の装置 (arrangement)、即ち下からの核酸類の除去も考えられると理解すべきである。例えば、溶解物バッファーのような核酸類を含むバッファーは、真空装置によって反応装置から単離装置内に直接抜き取られることができ、それにより、その核酸類が、単離装置において膜の底側へ結合されることが考えられる。そのような場合には、表面からの核酸類の除去は、核酸類の放出後、装置内の下側に排出される、下から抜き取られた溶出バッファーを用いて行われる。この場合には、核酸類の除去は、下側方向において行われる。

【0020】

例えば、流出 (flowthrough) 過程のために配置された膜とともに、その側面上に置かれたカラムは、溶解物を投入され、かつ水平に置かれたカラムが、核酸類が結合された膜の側面において、溶出バッファーにより次いですすがれる際には、核酸類の横方向の除去でさえ、可能である。

【0021】

可能な最大角度である180度のための例は、その上を種々の溶液又はバッファーが、下側へ流れる、核酸類の結合のために適当な表面を有する傾斜した表面である。全てのバッファーと同様に、この溶出バッファーもまた、一方の側から来て、他方の側へ流れ落ちる。この場合において、このバッファーの注入流及び核酸類を含むバッファーの排出流の方向は、180度の角度を形成する。しかし、その除去は、固定化と同様にその表面の同じ側において常に行われる。

【0022】

本発明の意味において、核酸類により、生物学的材料又は生物学的試料を含む全ての核酸類と同様に、核酸類の全ての水溶液又はその他の溶液が包含される。

本発明の意味において、この用語はフリーの核酸類、又は核酸を含む試料、又は、インビトロ (in vitro) 転写、PCR反応、若しくはcDNA合成のために適した抽出物として役立ち得る核酸類を含むサンプリング、又はサンプリング手順を用いて[得られた]物質へ適用し得る。生物学的材料又は生物学的試料により、例えば、欧州特許出願第95909684.3.号に記載されたような、例えば、血漿、血液、唾液、尿、糞、精液のような体液、細胞、血清、白血球フラクション、クルスタ催炎 (crustaphlogistica)、なすりつけ標本 (sneers)、あらゆる種類の組織試料、植物及び植物の部分、ウイルス、酵母等が意味される。本発明の意味において、核酸類により、例えば、2本鎖、1本鎖、環状及び鎖状、分岐等のような、全ての長さ及び配置 (configurations) の、リボ核酸類 (RNA) 及びデオキシリボ核酸類 (DNA)、モノマーヌクレオチド類、オリゴマー類、ウイルス性及び細菌性DNA並びにRNA、並びに動物及び植物細胞又は他の白血球からのゲノム、又は非ゲノムDNA及びRNA、処理された、又は未処理の形態のt-RNA、mRNA、hn-RNA、rRNA、及びcDNA、並びに他の想像し得る核酸類のような、全ての可能な種類の核酸類が意味される。

【0023】

本発明の方法において、前述の核酸類を含む試料は、適当な塩類又はアルコール(類)を含有する溶液内へ導入され、次いで、適当な場合においては、その試料を溶出し、かつ混合し、かつ、真空を用いて、遠心分離機の使用を介し、プラスの圧力を用いて、毛管現象の力により、又は表面上で核酸類が固定化される方法により、多孔性表面を介する他の適当な手段により、この方法において得られた混合物を通す。

【0024】

膜上での核酸類の固定化のための適当な塩類は、鉍酸類とのアルカリ又はアルカリ土類金属類の塩類、特に、アルカリ又はアルカリ土類ハロゲン化物又は硫酸塩、とりわけ好ましくは、硫酸ナトリウム又はカリウム又はマグネシウムのハロゲン化物を包含する。

【0025】

アルカリ又はアルカリ土類金属類を有する一若しくは多塩基酸類又は多官能性

(polyfunctional)有機酸類もまた、本発明の方法を行うために適合される。これらは、シュウ酸、マロン酸、又は琥珀酸のような有機ジカルボン酸類を有する、又はヒドロキシ若しくはポリヒドロキシカルボン酸類を有する、例えば、好ましくはクエン酸を有するナトリウム、カリウム、又はマグネシウム塩類を特に包含する。

【0026】

いわゆるカオトロピック剤の使用が、とりわけ効果的であることが立証された。カオトロピック物質は、水素結合の3次元構造を妨害することができる。この方法はまた、第1、第2、第3又は第4構造(primary, secondary, tertiary or quaternary structures)を包含する、生物分子内における空間構造の形成に関与する分子内結合力を弱める。この種のカオトロピック剤は、技術水準において専門家に知られている(H Dellwegにより発行されたRomp, Lexikon of Biotechnologie, R D Schmid 及びWE Fromm Thieme Verlag, Stuttgart 1992)。

【0027】

本発明における使用のために好ましいカオトロピック物質は、例えば、トリクロロ酢酸塩、チオシアン酸塩、過塩素酸塩又はヨウ化物群又は塩酸 Guanidinium及び尿素からの塩類である。

【0028】

前記カオトロピック物質は、0.01~10Mの水溶液中で、好ましくは0.1~7Mの水溶液中で、最も好ましくは0.2~5Mの水溶液中で使用される。上記のカオトロピック剤は、単独で又は組み合わせて使用され得る。特に、過塩素酸ナトリウム、塩酸 Guanidinium、イソチオシアン酸 Guanidinium、ヨウ化ナトリウム、又はヨウ化カリウムの0.01~10Mの水溶液、好ましくは0.1~7Mの水溶液、最も好ましくは0.2~5Mの水溶液。

【0029】

本発明の方法の実施のために適当なアルコール類は、脂肪族又は非環式飽和又は不飽和炭化水素類の全てのヒドロキシル誘導体をまず第一に包含する。問題となる化合物が、エチレングリコール、プロピレングリコール、又はグリセリンを包含する多価C1-C5アルカノール類のように、1-、2、3又はそれ以上の水酸基

を含むか否かは、最初は重要ではない。

【0030】

さらに、本発明のアルコール類は、ポリフェノールのようなフェノール類と同様に、糖誘導体、いわゆるアルダイト類 (aldit es) を包含する。

【0031】

上述のヒドロキシル化合物の間で、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、第3 (tertiary) ブタノール及びペンタノール類のようなC1-C5アルカノール類は、とりわけ好ましい。

【0032】

固定は、酸性、中性又はアルカリ性条件下において行われ得る。それ故、固定化におけるpHは、3~11の間であることができる。好ましくは、固定化はpH~8の間で行われる。RNAが単離されなければならない場合は、そのpHは、好ましくは中性領域にあり、一方、DNAの単離に関しては、酸性pHがより有利であり得る。よって、RNAの単離のためのpHは、例えば、6~8の間に、好ましくは6.5~7.5の間にあり得る。DNA単離のためには、そのpHは4~8の間において最も有利であり、好ましくは4~6の間であり得る。

【0033】

本発明の意味において、親水性という用語は、それらの化学的性質に基づいて、水と容易に混合し、又は水を吸収するような材料又は膜に適用する。

【0034】

本発明の意味において、疎水性という用語は、それらの化学的性質に基づいて、水中に浸透しないで、又はその逆の、かつその中に留まることができないような材料又は膜に適用する。

【0035】

本発明の意味において、表面という語により、いずれの微細孔分離 (microporous-separating) 層をも意味される。膜の場合には、その表面はポリマー材料のフィルムから成る。そのポリマーは、好ましくは極性基を有するモノマーから成り得る。

【0036】

本発明の方法の他の好ましい態様において、より広い意味における表面の概念は、粒子又は粒状体又は例えばシリカゲルフリース (fleece) のような滑らかな (even) 繊維の層を包含する。

【0037】

疎水性膜の使用に関連して、本発明の意味において、それらの膜としては、市販の疎水化 (hydrophobized) ナイロン膜のように、親水性物質からなり、かつ今日の技術水準において知られている後続の化学的処理により疎水性にされ得る膜が好ましい。本発明の目的のために、疎水化膜は、初めは親水性であることもないこともあり、かつ以下に記載の疎水性コート剤を用いてコートされるそれらの膜を一般に包含する。この種の疎水性コート剤は、かなり長いアルキル鎖又はシロキサン基のような、疎水基の薄膜を用いて親水性物質を覆う。適当な疎水性コート剤は、技術水準において多数知られている。本発明の目的のために、これらは、必要ならばアルミニウム又はジルコニウム塩類、四級有機化合物類、尿素誘導体類、脂質修飾メラミン樹脂類、シリコーン類、有機亜鉛化合物類、グルタル酸 (glutaric) ジアルデヒド及び類似物質の添加剤とともに、パラフィン類、ワックス類、金属石鹸類等を包含する。

【0038】

さらに、本発明の目的のために使用され得る疎水性膜は、疎水性にされ、かつその基材が極性基を含むものである。これらの基準によれば、例えば以下の群からの材料、特に疎水化されたものが、本発明における使用のために適当である。

【0039】

ナイロン、ポリスルホン類、ポリエーテルスルホン類、ポリカーボネート類、ポリアクリレート類及びアクリル酸共重合体類、ポリウレタン類、ポリアミド類、ポリ塩化ビニル、フルオロカーボネート類、ポリテトラフルオロエチレン類、ポリビニリデンフルオリド、ポリビニリデンジフルオリド、エチレン-テトラフルオロエチレン、ポリエチレン-クロロトリフルオロエチレン共重合化合物 (copolymerisate)、又はポリフェニレンスルフィド、及びセルロース混合 (cellulose-mix) エステル類、又はニトロセルロース類、並びに疎水化ガラス繊維膜。とりわけ好ましくは疎水化ナイロン膜。

【0040】

好ましい親水性表面は、それ自体が親水性の材料、かつ親水性にされた疎水性材料をも包含する。例えば、以下の物質が使用され得る。親水性ナイロン、親水性ポリエーテルスルホン類、親水性ポリカーボネート類、ポリエステル類、ポリプロピレン組織上の親水性ポリテトラフルオロエチレン類、ポリプロピレンフリース上の親水性ポリテトラフルオロエチレン類、親水化(hydrophilized)ポリビニリデンフルオライド、ポリビニリデンジフルオライド、親水化ポリテトラエチレン類、親水性ポリアミド類。

【0041】

本発明の方法において使用される膜は、例えば0.001~50 μ m 好ましくは0.01~20 μ m として最も好ましくは0.05~10 μ m の細孔直径を有する。

【0042】

洗浄バッファーのために、上述の塩類又はアルコール類、フェノール類又はポリフェノール類が使用され得る。洗浄段階における温度は、通常10~30°Cの範囲内であり得る一方、より高い温度もまた、良好に使用され得る。

【0043】

本発明の目的のために結合された核酸類の溶出のために適当な溶出剤は、水又は水性塩溶液である。塩溶液としては、技術水準において知られたバッファー溶液、例えばモルホリノプロパンスルホン酸(MPS)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TMS)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジノ]エタンスルホン酸(HEPES)が、0.001~0.5モル/リットル、好ましくは0.01~0.2モル/リットルの濃度において、最も好ましくは0.01~0.05Mの溶液が使用され得る。0.001~0.5、好ましくは0.01~0.2M 最も好ましくは0.01~0.05Mを含むアルカリ又はアルカリ土類金属塩類、特に、それらのハロゲン化物の水溶液、塩化ナトリウム、塩化リチウム、塩化カリウム又は二塩化マグネシウムの水溶液もまた、使用のために好ましい。シュウ酸又は酢酸のようなカルボン酸又はジカルボン酸を有するアルカリ又はアルカリ土類金属類の塩類の水溶液、酢酸ナトリウム又はシュウ酸エステル水溶液もまた、上記の濃度範囲、例えば、0.001~0.5、好ましくは0.01~0.2M 最も好ましくは0.01~0.05Mにおいて、使用のために好ましい。

【0044】

例えば、脱炭酸された (di mineralized)、二重蒸留された、又はミリポア (Millipore) 水のような純水は、溶出手段としてとりわけ好ましい。

【0045】

溶出は、10°C~70°Cの温度において、例えば、10°C~30°C、そしてより高い温度においてでさえ、良好に行われる。蒸気を用いた溶出もまた、可能である。

【0046】

個々の段階に関して、本発明の方法は、以下のように行われ得る。

【0047】

核酸類又は本来フリーの核酸 (類) の回収のために使用される試料の溶解物は、例えば、膜が固定された (プラスチック) カラム中に、例えば、底部の上に、ビベットで移される。それは、この膜が機械的支持体として作用するグリッドへ固定される場合に、より能率的である。この溶解物は、その後膜を通して運ばれ、それはカラムの排出口における真空の適用により達成され得る。その輸送はまた、溶解物へのプラスの圧力の適用によって達成され得る。さらに、上述の通り、溶解物の輸送は、遠心分離により、又は毛管現象力の効果により行われ得る。後者は、例えば溶解物又は濾過に接触させた膜の下に導入されるスポンジ様の材料を用いて行われ得る。

【0048】

本発明の好ましい態様において追加された洗浄段階は、表面又は膜を通して洗浄バッファーが輸送されたことにより、又はそれが核酸類として、同じ側に残されたことにより、行うことができる。もし、洗浄バッファーが通過され、又は抜き取られるならば、これは、例えば膜の他方の上に置かれたスポンジにより、真空若しくは高圧装置により、又は遠心分離若しくは重力により、様々な方法で行うことができる。

【0049】

装置の利点は、濾過液の供給のための簡単な、確かなかつ便利な可能性からなり、この場合においては、濾過液を用いて直ちに多少湿らされるスポンジのみが交換されることを要する。この点において、カラムは継続的に、又はバッチ法で

用いられることができ、かつこれらの操作モードの両方が、膜が核酸により完全に飽和されるまで、全て自動で行われ得ることが明らかであろう。最終段階は、ピペットにより抜き取られ、若しくは除去され、又はその他の方法において上側へ除去されることができ核酸の溶出である。いずれの場合においても、本発明の基礎である手順における溶出段階のために重要なことは、核酸類が、その膜の、それらが膜へ適用されたのと同じ側から除去される、即ち、膜を通した核酸類の移動はないことである。この一連の手順は、当初の溶解バッファー又は洗浄バッファーのような、もはや必要とされない全ての流体を、真空又は重力により“消耗側”へ輸送することを可能にし、一方、溶出液は、もう一方の側に残存する。この種の装置は、溶解物の添加又は溶出液の除去のためのピペッティング (pipetting) 装置が、表面の一方の側にのみ備えられなければならない、一方、表面の他方の側は、いかなる“清浄域 (clean area)” をも有することを必要しないので、本発明が基づく方法を特に簡単な手法において自動化することを可能にする。この方法において、空間分離により、核酸類の未汚染 (contamination-free) 単離、とりわけRNaseからの解放は、非常に簡単な手段により保証され得る。さらに、この単離装置、例えば洗浄カラムは、別の場所へ移される必要はなく、一方では、消耗を回避し、他方では、装置の同じ開口部を通して溶出液を回収する。これはまた、手順の自動化方法の簡略化を意味する。

【0050】

非常に希釈された溶液中に所望の核酸類を含有し、かつ後続の濃縮が要求されるフラクションの捕獲は、本発明の方法を用いると完全に必要なくなる。代わりに、所望の核酸類は、全ての分子生物学的分析手順のために極めて有用である、わずかな塩を含み、又は塩を含まない、非常に少量の溶液において得られる。なぜなら、これらは高濃度を有すると同時に可能な最小量において純粋な核酸類を要求するからである。可能な限り最小量の溶出液を得るという目的を達成するために、それらの膜は、表面として可能な限り薄いことが特に好ましく、それにより、わずかな流体のみがそれらの中に回収され得る。一方、シリカゲルフリースのようなフリースは、これらが比較的多量の溶出液を吸収しうするため、あまり望ましくなく、上側の溶出液の上方への除去をより困難にし、かつ好ましくない手

法において溶出液の必要量を増加する条件も、あまり望ましくない。

【0051】

さらに、本発明は、その装置が垂直位置に配置される（この膜はその後水平位置にされる）とき、膜の上側の空間は、反応領域として使用され得るという利点を有する。よって、例えば本発明の基礎である方法により生成された核酸類の単離及び放出の後、それらを除去しないことだけでなく、それらを単離装置内に残留させ、かつそれらに制限消化、RT、PCR、RT-PCR又は酵素反応のような分子生物学的応用を施すこと、本発明が基づく手順に従い、これらの反応により膜内に生成された核酸類を再度結合すること、ある場合にはそれらを説明されたように洗浄すること、かつ次いでそれらを溶出すること、それらを単離、又は例えば顕微鏡、蛍光計、又は同様の測定技術により分析することが可能である。

【0052】

本発明に従って単離された核酸類は、核酸類を分解する酵素から影響を受けず、かつ、それらが非常に多様な手法で直ちに処理され、かつ加工され得る程度に非常に高い精製の値を有する。

【0053】

本発明により生成された核酸類は、クローニングのために使用することができ、かつ、DNAポリメラーゼ類、DNA制限酵素類、DNAリガーゼ、及び逆転写酵素のような非常に多様な酵素のための基質として用いることができる。

本発明の方法により生成された核酸類は、増幅のために、特にPCR（ポリメラーゼ鎖反応）、鎖置換増幅(strand displacement amplification)、回転円法(rolling circle procedure)、リガーゼ鎖反応(LCR)、及び同様の手法のためにとりわけ良好に適合される。

【0054】

さらに、本発明が基づく方法は、診断における使用のため、特に本発明の方法により精製された核酸が、後続の段階において増幅され、かつこの手法で増幅された核酸が、その後続けて、又は直ちに検出されるという事実を特徴とする診断手順のための核酸類の調製のために特に良好に適合される（*z. B. Hblland, P. M. et al., 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 7276-7280. Li vak, K. J. et al., 1995. PCR*

Methods Appl. 4, 357-362; Kivits, T. et al., 1991, J. Virol. Meth. 35, 273-286; Lyttendael, M. et al., 1994, J. Appl. Bacteriol. 77, 694-701)。

【0055】

その上、本発明が基づく方法は、本発明が基づく方法により生成された核酸類が、特に、“分岐核酸類”、とりわけ以下の文献(例えば、Bresters, D. et al., 1994, J. Med. Virol. 43(3), 262-286; Collins M.L. et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25(15), 2979-2984)において説明された分岐DNA若しくは分岐RNA又は樹枝状(dendritic)核酸類と接触されることができ、かつ生じるシグナルが検出され得るという事実を特徴とするハイブリッド形成(hybridization)反応に基づくシグナル増幅段階へ続く段階において行われ得る核酸類の調製のために特に良好に適合される。

【0056】

本発明の方法の自動化のための例は、以下に説明され、かつ異なる表面及び核酸類を用いる方法を行うための例もまた、説明されている。この説明において、参照は、以下に記載する添付図により得られる。

【0057】

図1は、様式化された(stylized)グラフにおいて本発明の方法を行うために適当な自動装置を示す。

【0058】

図2は、本発明の方法を行うための単離装置及び収集管(collection tube)の第1の態様を示す。

【0059】

図3は、本発明の方法を行うための単離装置及び収集管の第2の態様を示す。

【0060】

図4は、本発明の方法を行うための単離装置及び収集管の第3の態様を示す。

【0061】

図5は、本発明による上部を有する単離装置の態様を示す。

【0062】

図6は、本発明の方法による様々な試料の電気泳動分離の臭化エチジウム染色

ゲルを示す。

【0063】

図7は、本発明の方法による様々な試料の電気泳動分離の他の臭化エチジウム染色ゲルを示す。

【0064】

本発明の方法は、部分的にも、又は完全にも、即ち全ての段階において、自動手段において好ましくは行われる。適当な自動装置のための例は、図1に説明され、そこには、主部1が、コントロールエレクトロニクス並びに作業プラットフォーム3及び可動アーム2を有する運転エンジンとともに備えられている。様々な装置を保持する領域4のように、様々な構成要素が、その作業プラットフォーム上に配置される。真空マニホールド(manifold)5は、それらの上に置かれた単離装置から液体を吸収し、かつ底において開放するために、又、別の方法においてはその真空マニホールドと結合された装置とともに働く。例えば、生物試料を溶解するために使用され得る振とう機6もまた、提供される。使用される単離装置アセンブリー(assemblies)は、例えば、本発明による表面が含まれる、統合された単離装置を有する射出成形部である。典型的に、8、12、24、48、96又は1536までの単離装置は、これらが例えば現代のマルチウェルプレート(multi-well-plates)の形態において見られるように、使用され得る。対応する基準が利用できるならば、1つのプレートにおいてより多数の単離装置を有する場合であっても許容され得る。しかし、ルーアアダプター(Luer-adapters)の助けにより、そのアセンブリーの個々の底を利用可能にすること及び必要に応じて1つ又はそれ以上の単離装置とともにこれらを備えることもまた可能である。ルーアアダプターなしで個別に使用される単離装置もまた、本発明に包含される。

【0065】

真空分配メカニズム8の下で、前記単離装置アセンブリーは、自動装置内に配置され、そしてこれらにより、液体が導入され、かつ排出され得る。このアセンブリーにおいて、いくつかの単一真空管は、単離及び反応装置の同時処理を可能にするように使用され得る。その真空分配メカニズム8は、それ故ビペットとし

て働く。真空及び圧力は、管9を介して真空分配メカニズム8へ与えられる。

【0066】

核酸類の単離のために、細胞を用いる反応装置は、例えば、溶解バッファーが分配メカニズムの助けにより導入される振とう機/保持具(holder)6内に配置されることが出来る。混合の後に、その細胞溶解物は、単離装置へ輸送される。この溶解バッファーは、単離装置内の表面を介して続けて通される。次いで、この表面は、細胞溶解物残留物の除去のために、洗浄バッファーを用いて洗浄されることができ、そこで洗浄バッファーもまた、下側へ排出される。最終的に、溶出バッファーは、単離装置内へ分配され、かつ繰り返された振とうの後に、分離された核酸類は、上方から除去され、そして収集管へ輸送される。

【0067】

試料の汚染防止のために、ディスポーザブルチップが真空分配メカニズム8において、通常用いられる。

図2～4は、本発明において使用されるべき適当な単離装置のための異なる概略例を示す。

【0068】

図2において、漏斗型単離装置10には、表面11、例えば溶解及び洗浄バッファーを吸収するために働くスポンジ様材料13を含む収集管12上に配置される膜が施される。スポンジ様材料13の下で、超吸収性(superabsorbent)層14は、真空効率を改善するために配置されることがある。代わりに、層14は、アクリル酸塩のように、水と化学的に反応し得る材料をも含有することがある。この水も、それ故この手順から除去される。核酸類の溶解物又は他の調製物は、漏斗内に置かれる。スポンジ様材料13は、膜11を通して適用された液体を吸収する。溶出バッファーの添加前に、そのスポンジは、例えば収集管12の内部メカニズム(図示されていない)により膜からいくらか動かされる。これは、最後の段階において溶出バッファーが、膜11を通して吸い出されることをも防ぎ得る。このバッファーは、主に表面(図1b)上に留まり、かつ上方から核酸類とともに除去され得る。このアセンブリーを使用する際は、自動装置内の真空メカニズム5は、もはや必要ではない。

【0069】

図3は、この場合にはスポンジは含まないが、マフ(muff)18を介して真空メカニズムに連結されるルアーアダプター17を介して、底に設置されたルアー接続(Luer-connection)を介して収集管16に連結される単離装置の他の例を示す。溶解及び洗浄バッファーは、この場合には真空の適用により膜11を通して吸引され得る。溶出バッファーが導入される際、その真空は止められたままであり、そのため、この溶出液は、上方から除去され得る。ルアー接続の使用により、個々の単離装置は、単離装置アセンブリーから除去され得る。しかし、真空収集管が固定された単離装置と組み合わせることもできることを忘れるべきではない。

【0070】

図4は、その中で前記バッファーが重力又は遠心分離されることにより抜き取られる真空管のために提供する態様を最終的に示す。少量使用されるその溶出バッファーは、本来、自然に膜11を貫通するのに十分なほど重くはなく、かつ上方から再度除去され得る。

【0071】

上述の手順は、以下の実施例により説明される。これに関連して、実施例1~17は、疎水性表面の使用を、かつ実施例1b~2bは、親水性表面の使用を主に包含する。これらの手順の使用の異なる様々な手法は、専門家には、前述の説明から、及び前記実施例から明らかであろう。参照は、これらの実施例及び対応する説明が、説明の目的のために単独で示され、かつ本発明における限界と見なされないという事実を明らかにする。

【0072】

実施例1

ヒーラー(HbLa)細胞からの全RNAの単離

化学的後処理により疎水性にされた市販の疎水性ナイロン膜(例えば、MS製材料:細孔直径12 μ mのマグナ(Magna)S又はバル社(Pall GmbH)製材料:細孔直径1.2 μ mのヒドロロン(Hydrolon))が、プラスチックカラム内に単一層で設けられる。これらの膜は、機械的支持体として働くポリプロピレングリッド上

に配置される。これらの膜は、リングを用いてプラスチックカラム内に固定される。

【0073】

この手法において調製されたカラムは、ルアー接続により真空チャンバーに接続される。全ての単離段階は、真空の適用を介して行われる。

【0074】

単離のために、 5×10^5 のヒーラー細胞が、遠心分離によりペレット状にされた。それらの細胞は、技術水準において完全に普通の手法で、市販のイソチオシアン酸グアニジニウムバッファー、例えば、キアゲン社 (Qagen Company) 製の RLT バッファーの 150 μ l の添加により溶解される。この溶解は、約 5 秒間のビベッティング又は攪拌 (vortexing) によるおおまかな混合により促進される。その後、150 μ l の 70% β -タノールが、約 5 秒間、ビベッティング又は攪拌 (vortexing) により添加されかつ混入される。

【0075】

前記溶解物は、その後プラスチックカラム内へ輸送され、かつ真空チャンバーを取り去ることにより膜を通して吸引される。そのように得られた条件の下で、RNA は膜に結合したままである。次に、洗浄はイソチオシアン酸グアニジニウムを含む第 1 市販洗浄バッファー、例えば、キアゲンの RWT バッファーを用いて、かつその後、TRI SX は TRI S 及びアルコールを含む第 2 洗浄バッファー、例えば、キアゲンの RPE バッファーを用いて行われる。それぞれの場合における洗浄バッファーは、真空チャンバーの取り除きにより、膜を通して吸引される。最終洗浄段階の後に、真空は、膜を乾燥するために約 10 分の間維持され、その後真空チャンバーはスイッチを切られる。

【0076】

溶出のために、70 μ l の RNase を含まない (RNase-free) 水が、膜から精製された RNA を放出するために膜上に輸送される。10~30°C の範囲の温度における 1 分間のインキュベーションの後に、溶出液は上方から、膜から輸送され、そして溶出段階は、溶出が完全であることを確実にするために繰り返された。

【0077】

この方法において得られた単離された全RNA量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定によりその後決定される。260nm及び280nmにおける吸光度間の比率から、RNA純度の評価を得る（図5参照：（ヒドロロン1.2を通して単離された）全RNA）。

【0078】

一方では親水性ナイロン（ニアフロ（Nyaflo））（3番）及びシリカ膜（4番）が使用された実験と比較して、疎水性ナイロン膜（1番及び2番）を用いた2つの単離の結果が、表1に示される。この表において報告された値は、印象的な（impressive）単離収量のための説得力のある（convincing）支持及び本発明に従って使用された材料の分離効果を提供する。それらは、シリカゲルフリースは、恐らくそのフリース様構造と大部分の溶出バッファのその後の吸収に恐らく起因する、明らかにわずかな収量しかもたらさないことを示す。

【0079】

【表1】

実施例1に従い単離された全RNAのRNA収量及び純度

番号	膜のタイプ	全RNAの収量(μg)	E260/E280
1	マグナSH 1.2 μm (疎水性ナイロン)	6	1.97
2	ヒドロロン1.2 μm (疎水性ナイロン)	7.1	2.05
3	ニアフロ (親水性ナイロン)	<0.2	未検出
4	親水性シリカ膜	<0.2	未検出

【0080】

単離されたRNAは、臭化エチジウムを用いて染色されたアガロースゲル上で分析されることもできる。この目的のために、例えば、1.2%ホルムアルデヒドアガロースゲルが構築される。結果は、図6において示される。

【0081】

図6において、レーン（Lane）1は、細孔直径1.2 μmのマグナSからの疎水性

ナイロン膜によって単離された全RNAである。

【0082】

レーン2は、細孔直径1.2μmのヒドロロンからの疎水性ナイロン膜によって単離された全RNAである。

【0083】

レーン3は、シリカ膜によって単離された全RNAのクロマトグラムを示す。

【0084】

それぞれの場合において、50μlの全RNA単離物が分析された。

図6は、シリカ膜が使用された際に、全RNAの測定可能な部分は何ら単離され得ないという説得力のある証拠を提供する。

【0085】

実施例2

種々の塩-アルコール混合物を用いたRNAの疎水性膜への結合によるフリーのRNAの単離。この実施例において、溶解物及び洗浄溶液は、真空の適用により疎水性膜を通して導かれる。

【0086】

疎水性ナイロン膜（例えば、バル社（Pall Company）製1.2μmヒドロロン）は、実施例1と同様の方法において、真空チャンバーと連結されたプラスチックカラム内へ導入される。

【0087】

全RNAを含む100μlの水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウムを含む350μlの市販の溶解バッファー（例えば、キアゲン製RLTバッファー）、350μlの1.2M酢酸ナトリウム溶液、350μlの2M塩化ナトリウム溶液及び350μlの4M塩化リチウム溶液とそれぞれビベッティングにより混合され、さらにそれぞれビベッティングにより混合される。

【0088】

次に、250μlのエタノールが、同様にビベッティングにより、各混合物へ添加され、そして混入される。その後、RNAを含むこれらの溶液は、プラスチックカラム内へ輸送され、そして真空チャンバーを取り除くことにより膜を通して吸引

される。記載された条件の下で、RNAは膜へ結合して残存する。これらの膜は、実施例1に記載されたように、その後洗浄される。

【0089】

上記RNAは、実施例1にも記載されたように、最終的に上方からビベットイングにより膜から除去される。

【0090】

単離された全RNA量は、260nmにおける吸光度の分光学的測定により決定される。260及び280nmにおける吸光度間の比率から、RNA純度の評価を得る。

【0091】

【表2】

種々の塩-アルコール混合物を用いたRNAの疎水性膜への結合によるフリーのRNAの単離

番号	塩-アルコール混合物	全RNAの収量(μ g)	E260/E280
1	キアゲンRLTバッファー/35%エタノール	9.5	1.92
2	0.6M酢酸ナトリウム/35%エタノール	8.5	1.98
3	1.0M塩化ナトリウム/35%エタノール	7.9	1.9
4	2M塩化リチウム/35%エタノール	4	2.01

【0092】

実施例3

ヒーラー細胞からの全RNAの単離

市販の疎水性ナイロン膜が、プラスチックカラム内に単一層で設けられる。これらの膜は、機械的支持体として働くポリプロピレングリッド上に設けられる。これらの膜は、リングを用いてプラスチックカラム内に固定される。この方法において調製されたカラムは、収集管内に配置される。全ての単離段階は、遠心分離を介して行われる。

【0093】

単離のために、 5×10^5 のヒーラー細胞が、遠心分離によりペレット状にされ、かつ上清物質が除去される。これらの細胞は、技術水準において完全に普通の方法で、150 μ lの市販のイソチオシアン酸グアニジニウムバッファー、例えばキアゲン製RLTバッファーの添加により溶解される。溶解は、約5分間のビベットイ

ング又は攪拌 (vortexing) によるおおまかな混合により促進される。150 μ l の 70% β -タノールが、約5分間のピペッティング又は攪拌 (vortexing) によりその後添加されかつ混入される。

【0094】

前記溶解物は、プラスチックカラム内へ続けて輸送され、かつ1分間10000 \times gにおける遠心分離により膜の中を通される。次いで、イソチオシアン酸グアニジニウムを含有する市販の洗浄バッファー、例えばキアゲンのRW1バッファーを用い、その後、例えばキアゲン製RPEバッファーのようなトリス及びアルコールを含有する第2洗浄バッファーにより洗浄が行われる。これらの洗浄バッファーは、遠心分離により膜の中を通される。最後の洗浄段階が、膜を乾燥するために2分間20000 \times gにおいて行われる。

【0095】

溶出のために、70 μ l のRNaseを含まない (RNase-free) 水は、膜から精製されたRNAを放出するために膜の上へ輸送される。10~30°Cの範囲の温度における1~2分間のインキュベーションの後に、その溶出物は、上方から膜から輸送され、かつその溶出段階は、溶出が完全であることを確実にするために繰り返される。

【0096】

この方法において得られた単離された全RNA量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定によりその後決定される。260nm及び280nmにおける吸光度間の比率から、RNA純度の評価を得る。

異なる疎水性ナイロン膜を用いた単離の結果は、表3に示される。

【0097】

膜当たり3~5回の並行試験が行われ、そしてその平均値が計算される。シリカ膜の使用により、溶出物がそれを膜から上方から除去することにより回収される場合、測定可能な量の全RNAは、単離され得ない。

【0098】

【表3】

疎水性膜への結合による実験例3に於いた全RNAのRNA収量

製造業者	膜	材料	RNA (μg)	280nm/280nm
ハルゲルマンサイエンス (Pall Gelman Sciences)	ヒトロ、1.2 μm	疎水性ナイロン	6.53	1.7
ハルゲルマンサイエンス	ヒトロ、3 μm	疎水性ナイロン	9.79	1.72
ハルゲルマンサイエンス	フルオロトランス G (Fluoro Trans G)	疎水性カルボキシル化ポリニリテン/ポリオレフィン	6.16	1.72
ハルゲルマンサイエンス	NFWA	ナイロン生地支持体上7クロムポリマー	2.91	1.73
ハルゲルマンサイエンス	ヘマセプ/ヘマジン (Hemasep V Medium)	修飾ポリエーテル	4.16	1.74
ハルゲルマンサイエンス	ヘマジン (Hemadyne)	修飾ポリエーテル	6.67	1.65
ハルゲルマンサイエンス	V-800R	弱疎水性修飾7クロム共重合体	6.26	1.72
ハルゲルマンサイエンス	スポンジ (Super)-450PR	疎水性ポリエーテルスポンジ	3.96	1.76
ハルゲルマンサイエンス	ヘルサボ-ル (Versapor)-1200R	弱疎水性修飾7クロム共重合体	6.23	1.68
ハルゲルマンサイエンス	ヘルサボ-ル-3000R	弱疎水性修飾7クロム共重合体	3.54	1.74
ハルゲルマンサイエンス	セフルボ-ル (Zefluor)	ポリテトラフルオロエチレン	5.19	1.65
ハルゲルマンサイエンス	ポリプロ-450	ポリエーテル繊維	4.58	1.77
ゴアテックス (GORE-TEX)	ポリプロ/デュレン/ポリアセチレン (Perforeted)	疎水性ポリテトラフルオロエチレン	3.6	1.59
	キル9337			
ゴアテックス	ポリプロ/デュレン/ポリアセチレン 9336	疎水性ポリテトラフルオロエチレン	2.15	1.65
ゴアテックス	ポリプロ/デュレン/ポリアセチレン 9335	疎水性ポリテトラフルオロエチレン	1.59	1.72
ゴアテックス	ポリエーテル/ポリ-9316	疎水性ポリテトラフルオロエチレン	3.61	1.69
ゴアテックス	ポリプロ/デュレン/ポリ-9317	疎水性ポリテトラフルオロエチレン	2.87	1.70
ミホア	ミテック (Mitec) 膜	疎水性ポリテトラフルオロエチレン	1.98	1.62
ミホア	DVHP	疎水性ポリニリテン/ポリオレフィン	7.45	1.72
MSI	マグナ (Magna)-SH, 1.2 μm	疎水性ナイロン	4.92	1.69
MSI	マグナ-SH, 5 μm	疎水性ナイロン	10.2	1.71
MSI	マグナ-SH, 10 μm	疎水性ナイロン	7.36	1.76
MSI	マグナ-SH, 20 μm	疎水性ナイロン	7.04	1.65

【0099】

実施例4

水溶液からのフリーのRNAの単離

実施例1に従って、プラスチックカラムは、異なる疎水性膜と組み合わせられた

。

全RNAを含有する100 μ lの水溶液は、イソチオシアン酸グアニジニウムを含有する市販の溶解バッファー、例えばキアゲン製RLTバッファー、350 μ lと混合される。次いで、250 μ lのエタノールが、ピペッティングにより添加され、そして混合される。この混合物は、その後カラムへ輸送され、遠心分離(10000 \times g; 1分)により、膜の中を通される。これらの膜は、続けてバッファー、例えばキアゲン製RPEにより2回洗浄される。このバッファーは、遠心分離により膜の中を通過させられる。最後の洗浄段階が、膜を乾燥するために20000 \times gで行われる。

【0100】

次いで、実施例3で既に記載された通り、RNAは、RNaseを含まない水を用いて溶出され、そしてピペッティングにより上方から膜から除去される。

【0101】

単離された全RNAの量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定により続けて決定される。260nm及び280nmにおける吸光度間の比率から、RNA純度の評価を得る。

【0102】

種々の疎水性膜を用いた単離結果を、以下の表4に記載する。

膜当たり3~5回の並行試験が行われ、そしてその平均値が計算される。シリカ膜の使用により、溶解物がそれを膜から上方から除去することにより回収される場合、測定可能な量の全RNAは、単離され得ない。

【0103】

【表4】

疎水性膜への結合による水溶液からのフリーのRNAの分離

製造業者	膜	材料	RNA (μg)	260nm/280nm
ハルゲルマンサイエンス	ヒドロ、1.2 μm	疎水性ナylon	5.15	1.75
ハルゲルマンサイエンス	ヒドロ、3 μm	疎水性ナylon	0.22	1.79
ハルゲルマンサイエンス	フルオロラスG	疎水性カルボキシル化ポリビニルピロリジンフルオロ	5.83	1.79
ハルゲルマンサイエンス	NFWA	ナylon生地支持体上アクリルポリマー	1.85	1.72
ハルゲルマンサイエンス	ヘマセア/ビスアミ	修飾ポリエステル	4	1.79
ハルゲルマンサイエンス	ヘマジン	修飾ポリエステル	0.47	2.1
ハルゲルマンサイエンス	V-800R	弱疎水性修飾アクリル共重合体	2.74	1.77
ハルゲルマンサイエンス	スポンル-450PR	疎水性ポリエーテルスルホン	5.97	1.71
ハルゲルマンサイエンス	ゼフィルール	ポリトラフルオロエチレン	8.67	1.69
ハルゲルマンサイエンス	ポリプロ-450	ポリエステル繊維	5.09	1.78
コアテックス	ポリプロレノバッキイM9337	疎水性ポリトラフルオロエチレン	5.96	1.62
コアテックス	ポリプロレノバッキイM9336	疎水性ポリトラフルオロエチレン	7.43	1.71
コアテックス	ポリプロレノバッキイM9335	疎水性ポリトラフルオロエチレン	4.35	1.63
コアテックス	ポリエステルポリ-ス9316	疎水性ポリトラフルオロエチレン	5.92	1.67
コアテックス	ポリプロレノポリ-ス9317	疎水性ポリトラフルオロエチレン	8.7	1.66
ミルボア	フルオロポリ(Fluoropore)PTFE	疎水性ポリトラフルオロエチレン	8.46	1.70
ミルボア	DVHP	疎水性ポリビニルフルオロ	4.23	1.8
MSI	マグナ-SH、1.2 μm	疎水性ナylon	1.82	1.76

【0104】

膜の細孔サイズに依存するヒラー細胞からの全RNAの単離

実施例1に従って、プラスチックカラムが異なる細孔サイズを有する異なる疎水性膜と組み合わせられた。

実施例3に従って、細胞溶解物が 5×10^5 のヒラー細胞から得られ、そしてこれらのカラムへ輸送される。次いで、これらの膜は、市販のバッファーであるキアゲンのRNA及びRFEを用いて洗浄される。最後の遠心分離段階が、膜を乾燥するために2分間20000×gにおいて行われる。溶出は、実施例1に記載の通りに行われる。

それらの結果を以下の表5に記載する。

膜当たり3～5回の並行試験が行われ、そしてそれぞれの平均値が計算される。

【0105】

【表5】

異なる細孔サイズを有する疎水性膜へ結合することにより単離された全RNAのRNA収量

製造業者	膜	材料	細孔サイズ(μm)	RNA(μg)	E ₂₆₀ /E ₂₈₀
インフィルテック (Infiltec)	ポリコン(Polycon)0.01	親水性ポリカーボネート	0.01	0.17	1.64
ハル	フルオロラシスG	疎水性ポリビニリデンジフルオライド	0.2	6.16	1.72
ハル	スボール-450PR	疎水性ポリエーテルスルホン	0.45	3.96	1.76
ミリポア	デュポア(Durapore)	疎水性ポリビニリデンジフルオライド	0.65	7.45	1.72
MSI	マガナ-SH	疎水性ナイロン	1.2	4.92	1.69
MSI	マガナ-SH	疎水性ナイロン	5	10.2	1.71
MSI	マガナ-SH	疎水性ナイロン	10	7.36	1.76
MSI	マガナ-SH	疎水性ナイロン	20	7.04	1.65

実施例6

水溶液からのゲノミック (genomic) DNAの単離

実施例3に従って、プラスチックカラムが、疎水性膜 (例えばMSI社製マグナ-SH 5 μ m) と組み合わされる。精製は、市販のキアゲンバッファーを用いて行われる。

200 μ lの肝臓組織からのゲノミックDNAの水溶液が、PBSバッファー内へ導入される。200 μ lの塩酸グアニジニウムを含有するバッファー、例えばキアゲンのALがこの溶液へ添加され、そして混合される。次いで210 μ lのエタノールが添加され、そして攪拌 (vortexing) を介して混合される。この混合物は、実施例3に従ってカラムへ輸送され、そして遠心分離の方法により膜の中を通される。この膜は、アルコール含有バッファー、例えばキアゲンのRWを用いてその後洗浄され、そして乾燥される。溶出は、実施例3に記載されたように行われる。3回の並行試験が行われ、その平均値が計算される。

【0107】

単離されたDNAの量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定により、次いで決定され、開始量のおよそ30%である。260nmから280nmにおける吸収率は、1.82である。

【0108】

実施例7

組織からのゲノミックDNAの単離

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜 (例えばMSI社製マグナ-SH 5 μ m) と組み合わされる。精製は、キアゲンの市販のバッファーを用いて行われる。

180 μ lのATLバッファーが10ngの腎臓組織 (マウス) へ添加され、機械的ホモジナイザー (homogenizer) 内ですり潰される。次いでプロテイナーゼ (proteinase) K (20 μ lの水において溶出されたおよそ0.4ng) が、添加され、そして55°Cにおいて10分間インキュベートされる。200 μ lの塩酸グアニジニウムを含有するバッファー、例えばキアゲン製ALを添加した後で、かつ70°Cにおける10分間のインキュベーションの後に、200 μ lのエタノールが添加され、そしてこの溶液と混

合される。この混合物は、カラム上へ置かれ、そして遠心分離により膜の中を通される。この膜は、アルコール含有バッファー、例えばキアゲン製AM及びRMを用いてその後洗浄され、次いで遠心分離により乾燥される。溶出は、実施例3に記載されたように行われる。3回の並行試験が行われ、そしてその平均値が計算される。

【0109】

単離されたDNAの量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定により続け決定され、平均は9.77 μ gである。260nmから280nmにおける吸収比率は、1.74である。

【0110】

実施例8

異なるカオトロピック剤の使用による水溶液からの全RNAの固定化

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。

100 μ lの全RNAを含有する水溶液が、異なる濃度においてイソチオシアン酸グアニジニウム (GITC) 又は塩酸グアニジニウム (GtHCl) を含有するの異なる溶解バッファー350 μ lと混合される。次いで、250 μ lのエタノールが、ピペッティングにより添加され、そして混合される。この混合物は、その後カラム上に置かれ、そして遠心分離 (10000 \times g; 1分) の方法によって膜の中を通される。これらの膜は、アルコール含有バッファー、例えばキアゲン製RFEを用いて次いで2回洗浄される。このバッファーは、遠心分離の方法により膜の中を通過させられる。最後の洗浄段階が、膜を乾燥するために20000 \times gにおいて行われる。溶出は、実施例3に記載されたように行われる。2回の試験が行われ、平均値を決定する。

結果を表6に記載する。

【0111】

【表6】

カオトロピック剤による水溶液からのRNA収量

膜	カオトロピック剤及び 結合溶液における濃度	全RNAの収量 (μg)
ヒドロロン、1.2 μl	GITC、500mM	2.3
ヒドロロン、1.2 μl	GITC、1M	0.8
ヒドロロン、1.2 μl	GITC、3M	0.9
フルオロランスG	GITC、500mM	0.4
フルオロランスG	GITC、1M	1.25
フルオロランスG	GITC、3M	0.6
ヒドロロン、1.2 μl	GuHCl、500mM	2.6
ヒドロロン、1.2 μl	GuHCl、1M	6.7
ヒドロロン、1.2 μl	GuHCl、3M	2.9
フルオロランスG	GuHCl、500mM	0.4
フルオロランスG	GuHCl、1M	1.25
フルオロランスG	GuHCl、3M	0.6

【0112】

実施例9

異なるアルコール類の使用による水溶液からの全RNAの固定化

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。全RNAを含有する100 μl の水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウム(濃度4M)を含有する350 μl の溶解バッファーと混合される。次いで、異なる量のエタノールとイソプロパノールが添加され、そして700 μl までのRNAseを含まない水とともに付加され、そして混合される。この混合物は、実施例3に従ってその後カラムへ輸送され、そして膜の中を通され、そして洗浄される。溶出は、実施例3と同様に行われた。

2回の試験が行われ、平均値が決定される。

結果を表7に記載する。

【0113】

【表7】

結合溶液における異なるアルコール類を含有する
水溶液からのRNA収量

膜	アルコール及び 結合溶液における濃度	全RNAの収量 (μg)
ヒトロソ、1.2 μm	エタノール、5%	0.7
ヒトロソ、1.2 μm	エタノール、30%	2.85
ヒトロソ、1.2 μm	エタノール、50%	4.5
DVHP	エタノール、5%	0.4
DVHP	エタノール、30%	1.25
DVHP	エタノール、50%	0.6
ヒトロソ、1.2 μm	イソプロパノール、5%	0.35
ヒトロソ、1.2 μm	イソプロパノール、30%	4.35
ヒトロソ、1.2 μm	イソプロパノール、50%	3.2
DVHP	イソプロパノール、10%	1.35
DVHP	イソプロパノール、30%	4.1
DVHP	イソプロパノール、50%	3.5

【0114】

実施例10

種々のpH値を有する水溶液からの全RNAの固定化

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。全RNAを含有する100 μl の水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウム(濃度4M)を含有する350 μl の溶解バッファーと混合される。このバッファーは、25mMのクエン酸ナトリウムを含有し、そしてHCl又はNaOHにより異なるpH値に調整される。次いで250 μl のエタノールが添加され、そして混合される。この混合物は、実施例4に従ってその後カラムへ輸送され、かつ膜の中を通され、そして洗浄される。溶出は、実施例3と同様に行われた。2回の試験が行われ、平均値が決定される。

。

結果を表8に記載する。

【0115】

【表8】

結合溶液における種々のpH値を有する水溶液からのRNA収量

膜	結合溶液におけるpH値	全RNAの収量 (μg)
ヒドロロン、1.2 μm	pH3	0.15
ヒドロロン、1.2 μm	pH9	1.6
ヒドロロン、1.2 μm	pH11	0.05
フルオロランスG	pH1	0.45
フルオロランスG	pH9	2.85
フルオロランスG	pH11	0.25

【0116】

種々の塩類を含有する水溶液からの全RNAの固定化

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。

100 μl の全RNA含有水溶液が、350 μl の塩含有溶解バッファー (NaCl、KCl、MgSO₄) と混合される。次いで、250 μl の水又はエタノールが添加され、そして混合される。この混合物は、実施例4に従って、その後カラムへ輸送され、かつ膜の中を通され、洗浄され、かつ溶出される。2回の試験が行われ、平均値が決定される。

結果を表9に記載する。

【0117】

【表9】

結合溶液における種々の塩を含有する水溶液からのRNA収量

膜	結合溶液における塩濃度	全RNAの収量(μg)
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、100mM; エタノールを含まず	0.1
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、1M; エタノールを含まず	0.15
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、5M; エタノールを含まず	0.3
ヒトロシ、1.2 μm	KCl、10mM; エタノールを含まず	0.2
ヒトロシ、1.2 μm	KCl、1M; エタノールを含まず	0.1
ヒトロシ、1.2 μm	KCl、3M; エタノールを含まず	0.25
ヒトロシ、1.2 μm	MgSO ₄ 、100mM; エタノールを含まず	0.05
ヒトロシ、1.2 μm	MgSO ₄ 、750mM; エタノールを含まず	0.15
ヒトロシ、1.2 μm	MgSO ₄ 、2M; エタノールを含まず	0.48
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、500mM; エタノール含有	2.1
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、1M; エタノール含有	1.55
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、2.5M; エタノール含有	1.35
ヒトロシ、1.2 μm	KCl、500mM; エタノール含有	1.6
ヒトロシ、1.2 μm	KCl、1M; エタノール含有	2.1
ヒトロシ、1.2 μm	KCl、1.5M; エタノール含有	3.5
ヒトロシ、1.2 μm	MgSO ₄ 、10mM; エタノール含有	1.9
ヒトロシ、1.2 μm	MgSO ₄ 、100mM; エタノール含有	4.6
ヒトロシ、1.2 μm	MgSO ₄ 、500M; エタノール含有(原文のまま!)	2

【0118】

実施例12

種々のバッファー条件による水溶液からの全RNAの固定

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。

全RNAを含有する100μlの水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウム(濃度2.5M)を含有する350μlの溶解バッファーと混合される。この溶解バッファーは、種々の濃度のpH7のクエン酸ナトリウム、又はpH7.2のシユウ酸ナトリウムと混合される。次いで、250μlのエタノールが、添加されそして混合される。この混合物は、実施例4に従ってその後カラムへ輸送され、かつ膜の中を通され、そして洗浄され、かつ溶出される。

それらの結果を表10に記載する。2回の試験が行われ、その平均値が決定される。

【0119】

【表10】

結合溶液における種々のバッファー濃度を有する水溶液からのRNA収量

膜	溶解バッファーにおけるクエン酸ナトリウム	全RNAの収量(μg)
ヒドロロン、1.2 μm	クエン酸ナトリウム、10mM	2.2
ヒドロロン、1.2 μm	クエン酸ナトリウム、100mM	2.4
ヒドロロン、1.2 μm	クエン酸ナトリウム、500mM	3.55
スポンール-450PR	クエン酸ナトリウム、10mM	1.1
スポンール-450PR	クエン酸ナトリウム、100mM	1.15
スポンール-450PR	クエン酸ナトリウム、500mM	0.2
ヒドロロン、1.2 μm	シュウ酸ナトリウム、1mM	1.5
ヒドロロン、1.2 μm	シュウ酸ナトリウム、25mM	1.05
ヒドロロン、1.2 μm	シュウ酸ナトリウム、50mM	0.9
スポンール-450PR	シュウ酸ナトリウム、1mM	1.9
スポンール-450PR	シュウ酸ナトリウム、25mM	1.3
スポンール-450PR	シュウ酸ナトリウム、50mM	1.7

【0120】

実施例13

フェノールによる水溶液からの全RNAの固定化

実施例3のように、疎水性膜を有するプラスチックカラム(例えば、バルゲルマンサイエンス社製ヒドロロン、1.2μm)が、組み立てられる。

RNA水溶液は、700μlのフェノールと混合され、遠心分離により膜全面に分配される。実施例4のように、この膜は洗浄され、RNAが溶出される。

二重測定が行われ、そしてそれぞれの場合において平均値が示される。260及び280nmにおける吸光度の間の比率から、RNA純度の評価を得る。

【0121】

実施例14

異なる塩条件下において固定化された全RNAの洗浄

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。

全RNAを含有する100μlの水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウム(濃度4M)を含有する350μlの溶解バッファーと混合される。次いで、250μlのETAノールが、添加され、そして混合される。この混合物は、実施例4に従い、その後カラムへ輸送され、かつ膜の中を通される。この膜は、種々の濃度のNaClを含有するバッファー及び80%ETAノールを用いて、その後2回洗浄される。そのバッ

ファーは、遠心分離により膜の中を通される。最後の洗浄段階は、膜を乾燥させるために20000× gにおいて行われる。溶出もまた、実施例3に従って行われる。

2回の試験が行われ、その平均値が決定される。

結果を表11に記載する。

【0122】

【表11】

洗浄バッファーにおけるNaClを含有する水溶液からのRNA収量

膜	洗浄バッファーにおけるNaCl	全RNA収量 (μg)
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、10mM	1.4
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、50mM	3.15
ヒトロシ、1.2 μm	NaCl、100mM	3
DHVP	NaCl、10mM	2.7
DHVP	NaCl、50mM	2.85
DHVP	NaCl、100mM	2.7

【0123】

実施例15

異なる塩及びバッファー条件の下において固定化されたRNAの溶出

実施例3に従って、プラスチックカラムが疎水性膜と組み合わせられる。

全RNAを含有する100μlの水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウム (濃度4 M) を含有する350μlの溶解バッファーと混合される。次いで、250μlのエタノールが、添加され、そして混合される。この混合物は、実施例3に従いカラムへ輸送され、かつ膜の中を通過させられ、そして洗浄される。

溶出において、膜から精製されたRNAを溶出するために、70μlのNaCl含有溶液、トリス/HCl バッファー (pH7) 又はシュウ酸ナトリウム水溶液 (pH7.2) が、膜上へ滴下される (pipetted)。1~2分のインキュベーションの後に、10~30°Cの間の温度において、溶出物が膜から上方から滴下される。この溶出段階は、完全な溶出を達成するために、一度繰り返される。2回の試験が行われ、その平均値が決定される。

結果を表12に要約する。

【0124】

溶出バッファーにおけるNaCl又はトリス/HClを含有する水溶液からのRNA収量

【表12】

溶出バッファーにおけるNaCl又はトリス/HClを含有する水溶液からのRNA収量

膜	溶出バッファーにおけるNaCl又はトリス	全RNA収量(μg)
ヒドロシ、1.2μm	NaCl、1mM	1.35
ヒドロシ、1.2μm	NaCl、50mM	1.2
ヒドロシ、1.2μm	NaCl、250mM	0.45
DVHP	NaCl、1mM	0.9
DVHP	NaCl、50mM	0.35
DVHP	NaCl、500mM	0.15
ヒドロシ、1.2μm	トリス 1mM	0.35
ヒドロシ、1.2μm	トリス 10mM	0.75
DVHP	トリス 1mM	1.5
DVHP	トリス 50mM	1
DVHP	トリス 250mM	0.1
ヒドロシ、1.2μm	シュウ酸ナトリウム、1mM	0.45
ヒドロシ、1.2μm	シュウ酸ナトリウム、10mM	0.65
ヒドロシ、1.2μm	シュウ酸ナトリウム、50mM	0.3
DVHP	シュウ酸ナトリウム、1mM	2
DVHP	シュウ酸ナトリウム、10mM	0.155
DVHP	シュウ酸ナトリウム、50mM	0.15

【0125】

実施例16

β-アクチン(actin) mRNAの増幅及び検出のための5'ヌクレアーゼPCR分析を使用する'リアルタイム'定量RT-PCRにおける全RNAの使用

実施例3に従って、プラスチックカラムが市販の膜(バルゲルマンサイエンス、1.2μmの細孔サイズを有するヒドロシ)と組み合わせられる。

RNAを単離するために、 1×10^5 のヒーラー細胞が使用され、そして全RNAの精製が、実施例3に記載されたように行われる。溶出は、実施例3に記載されたように、 $2 \times 60 \mu\text{l}$ の水を用いて行われる。DNAの残留量の完全な除去のために、試料は、分析前にDnaseを用いて処理される。

【0126】

"1装置(one device)"リアルタイム'定量RT-PCR'は、MMLV逆転写を使用することによるパーキンエルマー(Parkin-Elmer)の市販の反応系(タクマン(TaqMan)(TM)PCR試薬キット)の使用により行われる。 β -アクチンのための特異的プライマー及び特異的タクマンプローブ(パーキンエルマー製タクマン(TM) β -アクチン検出キット)の使用により、全RNA試料中の β -アクチンmRNA分子は、 β -アクチンcDNAにまず転換され、次いで全反応は、同じ反応装置において、妨害なしに直ちに増幅され、かつ検出される。この反応見本は、製造業者の指示に従い作成される。3種の異なる量の単離された全RNAが使用され(1、2、4 μ lの溶出液)、そして3回の決定試験が行われる。コントロールとして、RNAなしの3つの見本もまた、試験される。

【0127】

cDNA合成は、37°Cにおいて1時間行われ、その後直ちに40サイクルから成るPCRが行われる。それらの反応及び分析は、パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ(Parkin-Elmer Applied Biosystems)により組み立てられたABI PRISM TM 7700配列検出器において行われる。PCRサイクル中に発生したどのアンプリコン(amplicon)もみな、タクマンプローブからの分裂により発生した光放射分子を生成する。発生した全ての光シグナルは、発生したアンプリコン量に正比例し、従って全RNA試料において利用可能な転写物の当初の量に基づく。放射された光は、それらの装置により測定され、そしてコンピュータープログラムにより評価される。その間に光シグナルがバックグラウンドノイズ上で最初に検出されなければならないPCRサイクルは、"スレッショールドサイクル(Threshold Cycle)(ct)"として呼ばれる。この値は、試料において利用可能な特異的に増幅されたRNA量のための尺度である。

【0128】

ここに記載された方法により単離された全RNAの1 μ lの使用量に対し、結果は、平均ct値が17.1であり、全RNAにおける2 μ lに対して、ct値は16.4であり、かつ4 μ lの全RNAに対して、そのct値は15.3である。これは、全RNAとct値との間で一次従属する結果となり、このことは、全RNAが増幅反応を阻害し得る物質を含まないことを示す。RNAを含まないコントロール見本は、いずれのシグナルをも

もたささない。

【0129】

実施例17

β-アクチンmRNAの増幅及び検出のためのRT-PCRにおける全RNAの使用

実施例3に従って、プラスチックカラムが市販の膜(バルゲルマンサイエンス、1.2又は3μmの細孔サイズを有するヒドロロン; サルトリウス(Sartorius)、0.45μmの細孔サイズを有するサルトロン(Sartolon))と組み合わせられる。

【0130】

RNAの単離のために、2つの異なる原料が使用される。

- 1) 実施例4に記載の通りに精製、溶出が行われた、水溶液中の肝臓(マウス)由来の全RNA、並びに
- 2) 実施例3に記載の通りに全RNAの精製及び溶出が行われた 5×10^5 のヒラー細胞。

【0131】

それぞれの試験のために、20ngの単離された全RNAが使用される。コントロールとして、オールエヌイージー(RNasy)キット(キアゲン)により精製されたRNA及びRNAを含まない試料が使用される。

【0132】

RT-PCRは、標準条件下において、これらの試料を用いて行われる。増幅のために、2つの異なるプライマー対が、β-アクチンのために使用される。150bpのサイズに形成された(150bp-sized)フラグメントは、感度の証拠として役立ち、1.7kbのサイズに形成されたフラグメントは、RNAの完全な状態(integrity)を評価する。RT反応から、1μlが除去され、かつ後続のPCRへ輸送される。25サイクルは、小フラグメントに対して行われ、かつ27サイクルは大フラグメントに対して行われる。アニーリング(annealing)温度は55°Cである。増幅された試料は、非変性(non-denaturing)ゲル上に、次いで配置され、そして分析される。

【0133】

上述の方法において単離された全RNAの20ngの使用量に対して、対応するDNAフ

ラグメントがRT-PCRにおいて示され得る。ここで使用される条件は、ヒト β -アクトチンのために調整されているので、マウス肝臓由来の全RNAを使用する際には、転写は何ら示されない。RNAを含まないコントロール見本は、いずれのシグナルをもたさらない。

【0134】

図7は、RT反応の電気泳動分離の臭化エチジウム染色ゲルを示す。

A レーン1~8: 150bpフラグメントのRT-PCR;

レーン1、2: ヒドロロン1.2 μ n膜を用いて精製された水溶液からのRNA;

レーン3、4: サルトロン膜を用いて精製されたヒーラー細胞からのRNA;

レーン5、6ヒドロロン3 μ n膜を用いて精製されたヒーラー細胞からのRNA;

レーン7: アールエヌイージー・ミニキットにより精製されたRNA;

レーン8: RNAを含まないコントロール。

B レーン1~8: 1.7kbpフラグメントのRT-PCR;

レーン1、2: ヒドロロン1.2 μ n膜を用いて精製された水溶液からのRNA;

レーン3、4: サルトロン膜を用いて精製されたヒーラー細胞からのRNA;

レーン5、6: ヒドロロン3 μ n膜を用いて精製されたヒーラー細胞からのRNA;

レーン7: アールエヌイージー・ミニキットにより単離されたRNA;

レーン8: RNAを含まないコントロール。

【0135】

実施例1b

親水性膜との結合によるヒーラー細胞からの全RNAの単離

種々の材料から成る市販の親水性膜が、プラスチックカラム内に単一層で設けられる。実施例3の通りに、その膜はポリプロピレングリッド上へ置かれ、そしてリングを用いて固定される。

【0136】

単離のために、 5×10^5 のヒーラー細胞が挿入される。単離及び核酸の溶出のため以降の段階は、実施例3に記載されたように行われた。

【0137】

単離された全RNA量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定によりその

後決定される。260nm及び280nmにおける吸光度間の比率から、RNA純度の評価を得る。

【0138】

種々の親水性膜を用いた単離の結果は、以下の表1b (表13) に示される。膜当たり2~5回の並行試験が行われ、そしてそれぞれの場合における平均値が計算された。溶出物が、それが上方から抜き取られることにより膜から採取される場合に、シリカ膜の使用により測定可能量の全RNAは単離され得ない。

【0139】

【表13】

実施例1b)に基づく親水性膜との結合により分離されたRNAのRNA収量

製造業者	膜	材料	RNA (μ g)	260nm/280nm
ハルダマンザインズ	LC.E-450	親水性ポリエーテルスルホン	6.36	1.8
ハルダマンザインズ	LC.E-450sup	ポリエーテル生地上親水性ポリエーテルスルホン	3.07	1.71
ハルダマンザインズ	フレミタリクス	親水性ポリエーテルスルホン	1.66	1.63
ハルダマンザインズ	スポンル-800	親水性ポリエーテルスルホン	4.12	1.7
ハルダマンザインズ	スポンル-450	親水性ポリエーテルスルホン	4.69	1.69
ハルダマンザインズ	スポンル-100	親水性ポリエーテルスルホン	3.25	1.71
コアラックス	ポリデレン8339	ポリデレン生地上親水性ポリテトラフルオロエチレン	1.08	1.65
コアラックス	ポリデレンリクス8938	ポリデレンリクス上親水性ポリテトラフルオロエチレン	3.97	1.67
コアラックス	ポリエーテルリクス8918	ポリデレンリクス上親水性ポリテトラフルオロエチレン	3.61	1.69
ミホア	デュボネ7PVDF	親水性ポリビニリデンフルオライド	5.6	1.69
ミホア	ヒドロリクス(hydrophilized)PTFE	親水性ポリテトラフルオロエチレン	3.14	1.66
ミホア	デュボネ7PVDF	親水性ポリビニリデンフルオライド	3.12	1.68
サルトリウス (Sartorius)	メンブランフィルタータイプ250	親水性ポリアミド	4.3	1.66
インフィルテック	ポリコン 0.01	親水性ポリカーボネート	0.17	1.64
インフィルテック	ポリコン 0.1	親水性ポリカーボネート	0.79	1.68
インフィルテック	ポリコン 1	親水性ポリカーボネート	3.33	1.66

【0140】

親水性膜との結合による水溶液からのフリーのRNAの分離

実施例1bの通りに、種々の親水性膜とともにプラスチックカラムが組み立てられる。

全RNAを含有する100 μ lの水溶液が、イソチオシアン酸グアニジニウムを含有する市販の溶解バッファー、例えばキアゲンのRLTバッファー 350 μ lと混合される。その後、250 μ lのエタノールが、ピペッティングにより添加され、そして混合される。この混合物は、その後カラムへ輸送され、そして実施例4のように膜の中を通され、洗浄され、そして乾燥される。

その後、そのRNAは実施例3において既に説明されたようにRNaseを含まない水を用いて溶出され、そしてピペットにより膜から抜き取られる。

【0141】

単離された全RNA量は、260nmの波長における吸光度の分光学的測定によりその後決定される。260nm及び280nmにおける吸光度間の比率から、RNA純度の評価を得る。

種々の親水性膜を用いた単離の結果を、以下の表2b (表14) に示す。膜当たり2~5回の並行試験が行われ、そしてそれぞれの場合における平均値が計算された。溶出物が、それが上方から抜き取られることにより膜から採取される場合に、シリカ膜の使用により測定可能量の全RNAは単離され得ない。

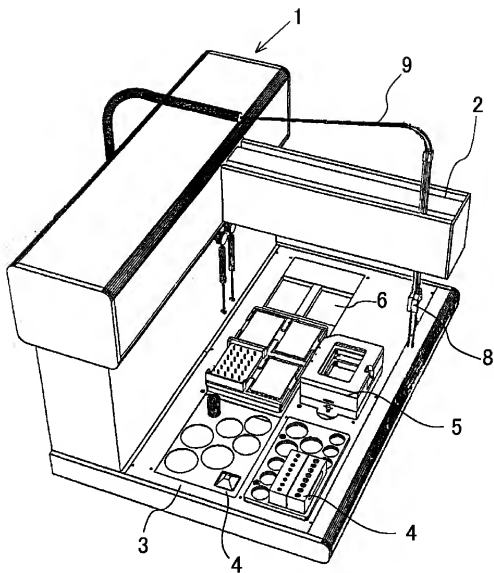
【0142】

【表14】

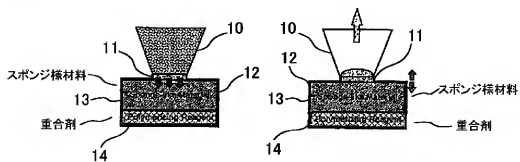
親水性膜との結合による水溶液からのフリーのRNAの分離

製造業者	膜	材料	RNA (μg)	260nm/280nm
ハルゲルマンサイエンス	LC.E-450	親水性ポリエーテルスルホン	1.92	1.82
ハルゲルマンサイエンス	LC.E-450sup	ポリエーテルウエビング上親水性ポリエーテルスルホン	0.87	1.67
ハルゲルマンサイエンス	スボール-800	親水性ポリエーテルスルホン	3.93	1.74
ハルゲルマンサイエンス	スボール-450	親水性ポリエーテルスルホン	1.78	1.74
ハルゲルマンサイエンス	スボール-100	親水性ポリエーテルスルホン	1.04	1.68
ゴアテックス	ポリプロピレン9339	ポリプロピレン生地上親水性ポリテトラフルオロエチレン	0.43	1.48
ゴアテックス	ポリプロピレンフリース9338	ポリプロピレンフリース上親水性ポリテトラフルオロエチレン	3.63	1.64
ゴアテックス	ポリエーテルフリース9318	ポリプロピレンフリース上親水性ポリテトラフルオロエチレン	5.92	1.67
ミボア	デュラボアPVDF	親水化ポリビニリデンフルオライド	1.18	1.79
ミボア	疎水化PTFE	親水化ポリテトラフルオロエチレン	2.84	1.72
サルトリアス	カンランイムター タイ7250	親水性ポリアミド	2.7	1.7

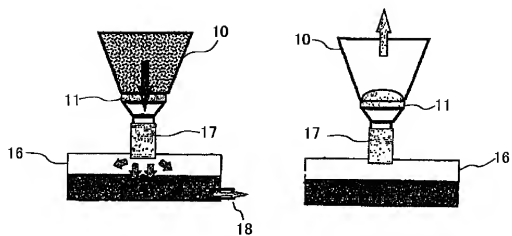
【図1】



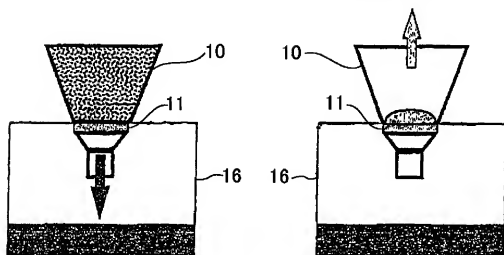
【図2】



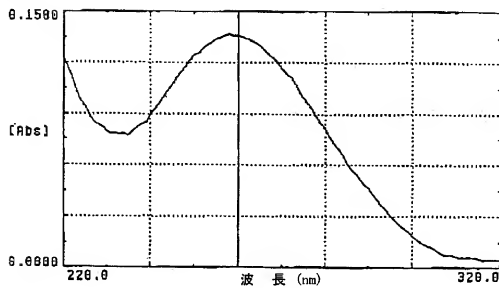
【图3】



【图4】



【図5】



【図6】



【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C1201/68		International Application No. PCT/EP 98/06756
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C120		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 649 853 A (BECTON DICKINSON AND CO.) 26 April 1995 see the whole document, in particular Example 2, claim 10	1-4
X	WO 87 06621 A (GILLESPIE D.) 5 November 1987 cited in the application see page 14, column 13 - page 17, column 15 see page 44, line 19 - page 45, line 21	1-3, 10-12, 23, 24, 26-33, 51-53
X	EP 0 487 028 A (SHIMADZU CORPORATION) 27 May 1992 see claims	56, 57
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date of priority claim and not in conflict with the applicant but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, each contribution being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 February 1999		Date of mailing of the international search report 05/02/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5816 Palantinus 3 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2090, Tx. 31 601 apo nl, Fax: (+31-70) 340-2015		Authorized officer Luzzatto, E

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/06756

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of documents, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 389 063 A (AKZO N.V.) 26 September 1990 see page 2, line 33 - page 3, line 54 see page 5, line 40 - page 8, line 25; claims	1
A	B. VOGELSTEIN ET AL.: "Preparative and analytical purification of DNA from agarose" PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, vol. 76, February 1979, pages 615-619, XP000607195 USA cited in the application see abstract see page 616, column 1, line 49 - page 617, column 1, line 7	1-53
P, X	EP 0 814 156 A (THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) 29 December 1997 see page 2, line 35 - page 3, line 55 see claims; example 2	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Serial Application No.

PCT/EP 98/05756

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 649853 A	26-04-1995	US 5438127 A	01-08-1995
		JP 2566383 B	25-12-1996
		JP 7177887 A	18-07-1995
		US 5650506 A	22-07-1997
		US 5616701 A	01-04-1997
		US 5606046 A	25-02-1997
		US 5610290 A	11-03-1997
WO 8706621 A	05-11-1987	US 5610291 A	11-03-1997
		AT 114334 T	15-12-1994
		AU 613870 B	15-08-1991
		AU 7432987 A	24-11-1987
		CA 1301606 A	26-05-1992
		DE 3750774 D	05-01-1995
		DE 3750774 T	27-04-1995
		EP 0305399 A	08-03-1989
		JP 2552691 B	13-11-1996
		JP 1502317 T	17-08-1989
		US 5482834 A	09-01-1996
EP 487028 A	27-05-1992	JP 4187077 A	03-07-1992
EP 389063 A	26-09-1990	NL 8900725 A	16-10-1990
		AT 156830 T	15-08-1997
		AU 641641 B	30-09-1993
		AU 5215390 A	27-09-1990
		CA 2012777 A	23-09-1990
		DE 69031237 D	18-09-1997
		DE 69031237 T	02-01-1998
		DE 389063 T	10-10-1995
		DK 389063 T	30-03-1993
		EP 0819696 A	21-01-1993
		ES 2085245 T	01-06-1996
		GR 96300019 T	31-03-1996
		GR 3025351 T	27-02-1998
		JP 2289596 A	29-11-1990
		JP 2680462 B	19-11-1997
EP 814156 A	29-12-1997	JP 10072485 A	17-03-1998
		US 5234809 A	10-08-1993
		CA 2207852 A	18-12-1997
		JP 10155481 A	16-06-1998

 フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 オエルミュラー ウーベ
 ドイツ連邦国、エルクラス D-40699.
 メールラゼル ヴェグ 46

(72) 発明者 ウルマン スザンヌ
 ドイツ連邦国、エルクラス D-40699.
 トリルス 19

Fターム(参考) 4B063 Q05 Q011 Q017 Q018 Q019
 Q012 Q032 Q041 Q082 Q015
 Q020 Q001